


INDUCED PROLIFERATION OF ANTIGEN-SPECIFIC IMMUNOSUPPRESSIVE CELL AND CULTURE TOOL USED THEREFOR

Patent number: JP11127851
Publication date: 1999-05-18
Inventor: YAMASHITA KENJI; FUKUCHI TAKESHI
Applicant: KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD
Classification:
- **International:** C12N5/06; C12M3/00; G01N33/531
- **European:**
Application number: JP19970301966 19971104
Priority number(s):

Also published as:

 JP11127851 (A)

Abstract of JP11127851

PROBLEM TO BE SOLVED: To prepare a large amount of an antigen-specific immunosuppressive cell holding an intact strong antigen-specific immunosuppressive ability by culturing a human cell in the presence of an antigen and further culturing the resultant cultured human cell in a culture tool containing an immobilized protein.

SOLUTION: A human cell is cultured in the presence of one or more antigens and the resultant cultured human cell is further cultured in a culture tool containing an immobilized protein which is an antibody or the like against the surface antigen of the human cell. The obtained cell is useful for treating diseases associated with anomalous acceleration of the immunological system such as treatment of autoimmune diseases or suppression of rejection of organ transplantation with slight adverse effects.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平 1 1 - 1 2 7 8 5 1

(43)公開日 平成11年(1999)5月18日

(51)Int. Cl. [°]	識別記号	F I		
C 1 2 N	5/06	C 1 2 N	5/00	E
C 1 2 M	3/00	C 1 2 M	3/00	Z
G 0 1 N	33/531	G 0 1 N	33/531	A
// A 6 1 K	35/14	A 6 1 K	35/14	A B C Z
	38/00		38/00	H
	審査請求 未請求 請求項の数 3 0	OL	(全 1 3 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平9-301966

(22)出願日 平成9年(1997)11月4日

(71)出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(72)発明者 山下 憲司

兵庫県高砂市米田町米田877-10

(72)発明者 福地 健

兵庫県明石市朝霧町3-123 セゾン朝霧3

04

(54)【発明の名称】 抗原特異的免疫抑制性細胞の誘導増殖方法およびこれに用いる培養器具

(57)【要約】

【課題】 効率よく免疫抑制性細胞を誘導増殖し、免疫系の異常亢進を伴う疾患の効率的で副作用の少ない治療システムを提供すること。

【解決手段】 1種以上の抗原存在下で培養したヒト細胞を、1種以上の蛋白質を固定化した培養器具で、さらに培養することによる該抗原に特異的免疫抑制性細胞の誘導増殖方法およびこれに用いる培養器具。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 1 種以上の抗原存在下で培養したヒト細胞を、1 種以上の蛋白質を固定化した培養器具で、さらに培養することによる該抗原に特異的免疫抑制性細胞の誘導増殖方法。

【請求項 2】 固定化する蛋白質がヒト細胞の表面抗原に対する抗体である請求項 1 記載の誘導増殖方法。

【請求項 3】 固定化する抗体が抗 CD 2 抗体および抗 CD 3 抗体である請求項 1 記載の誘導増殖方法。

【請求項 4】 抗 CD 2 抗体が CD 2 抗原の異なるエピトープを認識する 2 種以上の抗体である請求項 3 記載の誘導増殖方法。

【請求項 5】 固定化する抗体が抗 CD 3 抗体 OK T 3 である請求項 3 記載の誘導増殖方法。

【請求項 6】 固定化する抗体が抗 CD 2 抗体 TS 2 / 18 と抗 CD 3 抗体 OK T 3 である請求項 3 記載の誘導増殖方法。

【請求項 7】 固定化する抗体が抗 CD 2 抗体 35. 1 と抗 CD 3 抗体 OK T 3 である請求項 3 記載の誘導増殖方法。

【請求項 8】 固定化する蛋白質が 1 種以上のサイトカインである請求項 1 記載の誘導増殖方法。

【請求項 9】 サイトカインが IL-2 である第 8 項記載の誘導増殖方法。

【請求項 10】 抗原が自己免疫疾患の原因となる抗原である請求項 1 記載の誘導増殖方法。

【請求項 11】 自己免疫疾患がインスリン依存性糖尿病である請求項 10 記載の誘導増殖方法。

【請求項 12】 抗原がインスリン、プロインスリン、又は GAD である請求項 10 又は 11 記載の誘導増殖方法。

【請求項 13】 自己免疫疾患がリウマチである請求項 10 記載の誘導増殖方法。

【請求項 14】 抗原が異種および同種の移植臓器由来のものである請求項 1 記載の誘導増殖方法。

【請求項 15】 抗原が異種および同種の移植臓器由来のもので、該移植臓器の拒絶に関与するところの抗原である請求項 1 記載の誘導増殖方法。

【請求項 16】 1 種以上の抗原存在下で培養したヒト細胞を、1 種以上の蛋白質を固定化した培養器具で、さらに培養することによる該抗原に特異的免疫抑制性細胞の培養器具。

【請求項 17】 固定化する蛋白質がヒト細胞の表面抗原に対する抗体である請求項 16 記載の培養器具。

【請求項 18】 固定化する抗体が抗 CD 2 抗体および抗 CD 3 抗体である請求項 16 記載の培養器具。

【請求項 19】 抗 CD 2 抗体が CD 2 抗原の異なるエピトープを認識する 2 種以上の抗体である請求項 18 記載の培養器具。

【請求項 20】 固定化する抗体が抗 CD 3 抗体 OK T

3 である請求項 18 記載の培養器具。

【請求項 21】 固定化する抗体が抗 CD 2 抗体 TS 2 / 18 と抗 CD 3 抗体 OK T 3 である請求項 18 記載の培養器具。

【請求項 22】 固定化する抗体が抗 CD 2 抗体 35. 1 と抗 CD 3 抗体 OK T 3 である請求項 18 記載の培養器具。

【請求項 23】 固定化する蛋白質が 1 種以上のサイトカインである請求項 16 記載の培養器具。

【請求項 24】 サイトカインが IL-2 である請求項 23 記載の培養器具。

【請求項 25】 抗原が自己免疫疾患の原因となる抗原である請求項 16 記載の培養器具。

【請求項 26】 自己免疫疾患がインスリン依存性糖尿病である請求項 25 記載の培養器具。

【請求項 27】 抗原がインスリン、プロインスリン、又は GAD である請求項 25 又は 26 記載の培養器具。

【請求項 28】 自己免疫疾患がリウマチである請求項 25 項記載の培養器具。

【請求項 29】 抗原が異種および同種の移植臓器由来のものである請求項 16 記載の培養器具。

【請求項 30】 抗原が異種および同種の移植臓器由来のもので、該移植臓器の拒絶に関与するところの抗原である請求項 16 記載の培養器具。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、免疫抑制性細胞、特に抗原特異的な免疫抑制性細胞の誘導増殖方法およびこれに用いる培養器具に関する。さらに詳しくは、予め抗原と培養したヒト細胞を、抗体を固定化した培養器具でさらに培養することによる該抗原に特異的免疫抑制性細胞の誘導増殖方法およびこれに用いる培養器具に関する。

【0002】

【従来の技術】自己免疫疾患および移植時の拒絶反応は宿主の細胞が自己の細胞や移植された臓器を異物として認識し、破壊することにより引き起こされる疾患であり、その破壊に関与する自己細胞あるいは移植臓器特異的傷害性細胞を抑制する免疫抑制性細胞の量的あるいは質的な異常がその原因であるとする例がいくつか知られている (マッキントッシュ (Macintosh) およびドラクマン (Drachman)、サイエンス (Science) 232 巻、401 頁 (1986 年) 参照)。バラショフ (Balashov) らの報告 (バラショフら、ジャーナル・オブ・クリニカル・インベストイゲーション (Journal of Clinical Investigation) 95 巻、2711 頁 (1995 年) 参照) では、MS (多発性硬化症) 患者においては自己混合リンパ球反応による免疫抑制性 T 細胞の誘導効率に著しい低下がみられ、それが同疾患発症

の原因としている。したがってそのような患者の免疫抑制性細胞、それも特に自己の細胞あるいは移植された臓器を特異的に認識し、攻撃するT細胞を特異的に抑制する細胞（以下、抗原特異的免疫抑制性細胞と呼ぶ）を回復させることはその治療法としてきわめて有効であると考えられる。これまで、抗原特異的免疫抑制性T細胞の誘導例としてはフレズノ（Fresno）ら（フレズノら、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン（Journal of Experimental Medicine）163巻、1246頁（1980年）参照）らの正常マウスでのインビボ誘導例、また実際、疾患モデル動物を用いた系での抑制性細胞による治療例としてハリソン（Harrison）ら（ハリソンら、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン（Journal of Experimental Medicine）184巻、2167頁（1996年）参照）等マウスなどの動物を用いた系でいくつか報告されている。また、ヒトでの抗原特異的免疫抑制細胞誘導例として、ダムル（Damle）ら（ダムルら、ジャーナル・オブ・イムノロジー（Journal of Immunology）132巻、644頁（1984年）参照）のPPD抗原特異的抑制細胞をインビトロで誘導している例、あるいは、同じくダムルら（ダムルら、ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン（Journal of Experimental Medicine）158巻、159頁（1983年）参照）のアロ細胞特異的抑制性細胞をインビトロで誘導している例がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】インビトロで抗原特異的な免疫抑制性細胞を誘導することは自己免疫疾患治療あるいは臓器移植の拒絶反応の抑制を行う時、その抑制能、特異性を確認した上で治療に用いることができるという点で安全かつ効果的な方法であるといえる。ところが一般的にインビトロでの抗原特異的免疫抑制性細胞の誘導は用いる抗原によってその効率にかなり差があり、用いる抗原すべてについて効率的に誘導を行い、大量の抑制性細胞を得ることは難しい。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決すべくPPDをモデル抗原として効率的に抗原特異的免疫抑制性細胞を作製する方法を鋭意検討した結果、患者の血液細胞を体外に取り出し、抗原特異的免疫抑制性細胞を誘導、増殖させ、再び戻すことにより、強い抗原特異的免疫抑制能を保ったまま、大量の抗原特異的免疫抑制性細胞を作製することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0005】即ち、本発明の第1は、1種以上の抗原存在下で培養したヒト細胞を、1種以上の蛋白質を固定化した培養器具で、さらに培養することによる該抗原に特

異的免疫抑制性細胞の誘導増殖方法に関する。また本発明の第2は、1種以上の抗原存在下で培養したヒト細胞を、1種以上の蛋白質を固定化した培養器具で、さらに培養することによる該抗原に特異的免疫抑制性細胞の培養器具に関する。

【0006】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳述する。本発明に用いる「ヒト細胞」とは、ヒトの体を構成する細胞およびこれに由来する細胞であり、たとえばヒト末梢血細胞、ヒト腹腔細胞、ヒト胸腺細胞、ヒト骨髓細胞、ヒト株化T細胞などがあげられる。細胞移入という方法で実際に患者の治療を行う場合、免疫の拒絶反応あるいは抑制効果を考えてもその患者自身の細胞を用いることが最も望ましく、そのなかでもヒト末梢血細胞が採取の容易さの点で好ましい。末梢血細胞は、ヒトからの採血により得た静脈血を50mlのポリスチレンチューブに入れたフィコール（フィコールバック（Ficoll-Paque）：ファルマシア社製）の上に重層し、1分間1500回転で20分間遠心することにより、境界面に形成されるリンパ球、単球画分を分離し、RPMI-1640培地で3回洗浄することにより得られる（フィコール遠心分離法）。T細胞は、こうして得られたヒト末梢血細胞を培養液中に播種して一晚培養したのち、浮遊細胞を集めることにより得られる。

【0007】本発明に用いる「蛋白質」とは、細胞表面抗原、細胞表面抗原やサイトカイン受容体に対する抗体またはその誘導体、サイトカインなどがあげられるが、効率的な細胞増殖活性を誘導する点でヒト細胞の細胞表面抗原に対する抗体、サイトカインが好ましい。これらの蛋白質は、単独または二種以上を併用することができる。

【0008】「細胞表面抗原に対する抗体」とは、細胞と細胞の接着を媒介する機能を有する蛋白質に対する抗体あるいは接着時に二次的に相手細胞上の分子との結合に関与する蛋白質に対する抗体、そして種々のサイトカインに対する受容体に対する抗体をいうが、たとえば免疫グロブリン・スーパー・ファミリー、インテグリン・スーパーファミリー、カドヘリンなどに対する抗体あるいはIL-2受容体があげられる。好ましくは、免疫グロブリン・スーパー・ファミリー、とくに好ましくは、ヒトT細胞のCD2抗原あるいはCD3抗原に対する親和性を有する抗体およびその類似体である。

【0009】ここで「CD2抗原に対する抗体（抗CD2抗体）」としては、CD2抗原の種々のエピトープに対するモノクローナル抗体あるいはCD2抗原に対するポリクローナル抗体などがあげられるが、好ましくは抗CD2抗体TS2/18、抗CD2抗体35.1があげられる。またこれらのF(ab)2断片も使用可能である。

【0010】また「CD3抗原に対する抗体（抗CD3

抗体)」としては、同じくCD3抗原を認識するモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体などがあげられるが、好ましくは抗CD3抗体OKT3があげられる。またこれらのF(ab)2断片も使用可能である。「CD2抗原の異なるエピトープを認識する抗体」とは、CD2表面抗原分子の異なる部分を認識し、結合する抗体を意味する。この抗体は、二種以上を併用することができる。1種では、細胞増殖効率が不十分な場合もあるからである。

【0011】「サイトカイン」としては、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-8レセプターファミリー、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-13、IL-15、GM-CSF、G-CSF、TGF- β 、TNF- α 、TNF- β 、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、マクロファージ活性化因子、マクロファージ遊走阻止因子等があげられるが、特にIL-2が好ましい。これらのサイトカインは、単独または二種以上を併用することができる。IL-2は末梢血から分離したもので、また遺伝子組み替えにより調製したものでよい。

【0012】本発明に用いる「抗原」とは、自己免疫疾患の原因となる抗原、異種および同種の移植臓器由来の抗原、結核菌抗原PPD抗原(Purified Protein Derivative)、破傷風抗原TT(Tetanus Toxoid)等の免疫抑制性細胞の誘導のためのモデル抗原などがあげられる。これらの抗原は、単独または二種以上を併用することができる。

【0013】「自己免疫疾患の原因となる抗原」としては、インスリン依存型糖尿病、リウマチ、潰瘍性大腸炎、橋本甲状腺炎、多発性硬化症などの原因抗原があげられる。「インスリン依存型糖尿病の原因抗原」としては、インスリン、プロインスリン、GAD、IA-2、カルボキシペプチダーゼH、ウィルスなどがあげられる。

【0014】「リウマチの原因抗原」としては、コラーゲン、ウィルスなどがあげられる。「異種および同種の移植臓器由来の抗原」としては、該移植臓器の拒絶に関与するところの抗原などがあげられる。本発明でいう「免疫抑制性細胞」とは、免疫反応を抑制する能力を有する細胞をいう。この免疫応答抑制活性の測定は、たとえば異なる2つあるいはそれ以上の数の個体から調製した末梢血細胞を混合する反応系(MLR)、あるいはある抗原に対する反応性を持つT細胞(メモリーT細胞)を持つ個体の末梢血細胞とその抗原を混合する反応系などを用いて行うことができる。例えばインビトロにおいて同一人から新たに得たヒト末梢血細胞(以下、PBLと呼ぶ)に、免疫抑制性を有すると思われる細胞を加え、さらにPPD(ピュアリファイド・プロテイン・デリバティブ(Purified Protein Deriv

ative)日本ビーシージー社製)を加えて37°C、5%CO₂の条件下で数日間培養したのち、³Hチミジンを添加し、さらに5~16時間培養したのち、細胞中の放射活性をシンチレーションカウンターで測定することにより行うことができる。

【0015】本発明でいう「抗原特異的な免疫抑制性細胞」とは上記の免疫抑制性細胞に含まれるもので、免疫抑制性細胞の中でも特にある抗原に対して特異的に活性化される細胞のみを選択して抑制する細胞を指し、例として本明細書の実施例中のPPDであらかじめ培養することにより得られた細胞で、PPDで刺激することによる細胞の活性化の系に加え培養することによりこの活性化を抑制する能力を持つ細胞をあげることができる。

【0016】本発明における抗原特異的な免疫抑制性細胞の誘導増殖方法を以下に説明する。1~10%のオートローガス血清を含む培地で調製したヒト細胞を培養プレートに分注する。各ウェルに抗原を加え、3~7日間培養する。該細胞を血清を含まない培地で洗浄した後、1~10%のオートローガス血清を含む培地に懸濁し、抗原特異的な免疫抑制性細胞を誘導する。

【0017】抗原の使用量は0.1~10 μ g/mlが好ましい。少なすぎる場合には充分量の抗原特異的な免疫抑制性細胞が誘導されない可能性があり、多すぎる場合には用いる細胞量が律速となり上記の抗原使用量での誘導以上の誘導は得られない可能性があるとともに細胞に対する毒性を考慮する必要もあり好ましくない。ここで用いることができる培地としては、たとえば動物培養用培地、D-MEMやRPMI-1640があげられる。また、培地に血清を含有させてもよい。好ましくは自己血清を用いる。自己血清とは、培養に用いるヒト細胞と同じ個体よりえられた血清をいう。自己血清を用いると細胞増殖性がよく、非特異的な免疫反応も起こりにくく、最も好ましい。血清の添加量はとくに限定されないが、0.5~10v/v%が一般的である。

【0018】次に1種以上の抗原存在下で培養することにより誘導した抗原特異的な免疫抑制性細胞を、前記の細胞表面抗原、細胞表面抗原やサイトカイン受容体に対する抗体またはその誘導体、サイトカイン等の蛋白質を固定化した培養器具で培養することにより、免疫抑制性細胞が増殖できる。固定化する蛋白質の量は、用いる蛋白質によって異なり、とくに限定されないが、0.1~10 μ g/mlが好ましい。少なすぎる場合には、免疫抑制活性の誘導が行われないおそれがあり、多すぎる場合には、細胞に傷害を与える可能性がある。

【0019】蛋白質の固定化方法としては、一般的に疎水結合、イオン結合、共有結合を利用した方法が用いられ、簡便な方法として蛋白質に親和性を有する部材に疎水結合を利用して固定化する方法、またより強固に固定化する方法として固定化する蛋白質と親和性を有する部材を共有結合させる方法があげられる。用いることがで

きる培地としては、たとえば動物培養用培地、D-MEMやRPMI-1640があげられる。また、培地に血清を含有させてもよい。好ましくは自己血清を用いる。自己血清とは、培養に用いるヒト細胞と同じ個体よりえられた血清をいう。自己血清を用いると細胞増殖性が高く、非特異的免疫反応も起こりにくく、最も好ましい。血清の添加量はとくに限定されないが、0.5~10v/v%が一般的である。ヒト細胞をこのような培地中で、通常37°C、5%CO₂の条件下で好ましくは1~7日間、より好ましくは1~7日間、特に好ましくは1~3日間培養することにより、免疫抑制性細胞が増殖できる。

【0020】本発明で用いる培養器具は細胞毒性のない滅菌可能で蛋白質に親和性を持つ部材であればよく、一般的にはプラスチック系あるいはガラス系の部材が好ましい。プラスチック系部材とは熱硬化性樹脂と熱可塑性樹脂を意味し、成型性が優れているという理由でポリマーがより好ましく、蛋白質に対する親和性が高く、無色透明であるという理由でポリスチレンがとくに好ましい。ガラス系部材とはケイ酸塩、ホウ酸塩、リン酸塩などが結晶することなく固化したもの（ガラス化という）を意味し、ガラス化傾向が強いという理由でケイ酸塩ガラスがより好ましく、成型性に富み、対衝撃性が高いという理由でケイ酸塩ガラスを熱処理することによりつくる結晶化ガラスが特に好ましい。また、培養器具に蛋白質に対する親和性を付与するため、部材に蛋白質の吸着性を高める処理を行ってもよい。通常細胞培養に用いられる培養器具はコラーゲンなどの蛋白質で固定化されているので、蛋白質の吸着性を低下させており本発明に用いる部材としては好ましくない。本発明に用いる細胞培養器具において細胞が直接接着する部材面の形状としては、蛋白質の固定化を均一に行い、さらに細胞の接着を均一に効率的に行う必要があるため、平板状あるいは球状形が好ましい。さらに好ましくは培養器具は平板プレート状閉鎖系容器または球状微粒子を充填した閉鎖系容器である。平板状のものでは通常の培養フラスコ、培養ディッシュ、培養プレートの形状をしたものまたは図1-(a)~(c)に示したような多段式のプレートが使用可能である。図1に示された多段式プレートは本発明の培養器具の実施の一形態である。図1(a)に示すように、矢印の方向からヒト細胞1を含む細胞懸濁液2が添加される。図1(b)に示すように培養時は図1(a)の器具を90°回転させる。培養時には通気性フィルターをへて5%CO₂が送られ、誘導された免疫抑制性細胞はやや強く振とうすることによってはがされ細胞回収口から得られる。図1(c)は図1(b)を上から見た図である。このような多段式プレートを用いる場合、一度に多くの細胞を処理できるだけでなく、一度に複数の異なる機能を有する細胞を誘導作製できる利点がある。たとえば固定化する抗体を変えることにより免疫

抑制性の細胞および免疫抑制機構を賦活する能力を有する細胞を同時に誘導することが可能である。部材が球状形のものでは小型球形ビーズを図2に示したような容器に入れ使用することが可能である。

【0021】図2に示された容器は本発明の実施の別の形態である。図2中、5%CO₂は通気性フィルター23をへて、ヒト細胞を含有する細胞懸濁液22に送られる。球状微粒子25は細胞懸濁液22中に存在しヒト細胞が接着している。誘導された免疫抑制性細胞は球状微粒子に接着したままコック26をあけて回収される。27は側壁を示す。そのうち、生理食塩水などで洗浄することにより、誘導された細胞が得られる。

【0022】本発明では主にELISA反応に用いる平板状のプラスチックプレートを器具として用いるのがとくに好ましい。本発明で誘導増殖された抗原特異的免疫抑制性細胞の投与経路は限定されないが、カテーテルなどの医療器具を用い、全身または局所に投与されるのが望ましい。

【0023】投与される細胞量としては、投与の目的、すなわち疾病の種類および投与する患者の症状の程度によっても異なるが、成人一日あたり細胞数として10⁶~5×10⁶個、好ましくは10⁶~10⁷個、特に好ましくは10⁷個である。本発明の抗原特異的免疫抑制性細胞の誘導増殖方法は、簡便にかつ効率的に抗原特異的免疫抑制性細胞を誘導増殖する方法を提供するもので、種々の自己免疫疾患や臓器移植の拒絶反応の抑制を目的とした治療において、副作用が少なくかつ効率的な方法を提供するものである。

【0024】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

実施例1 抗原特異的免疫抑制性細胞の誘導

10%のオートローガス血清を含むRPMI-1640（シグマ社製）で1×10⁶/mlの濃度に調製した健康成人ヒト末梢血細胞を12穴ウェル平底プレートに2mlずつ分注した。各ウェルに結核菌抗原PPD（日本ビーシー社製）を終濃度1μg/mlになるように加え、7日間培養した。培養7日後の細胞数は8×10⁶/mlであった。同細胞を血清を含まないRPMI-1640培地で3回洗浄した後に10%オートローガス血清を含むRPMI-1640培地中に0.25×10⁶/mlになるように懸濁し、細胞懸濁液を得た。

実施例2 抗体固定化プレートで処理したヒト末梢血細胞の調製

あらかじめ抗CD3抗体OKT3（オース・ダイアグノスティック・システム・インク（Ortho Diagnostic System Inc.）社製）と抗CD2抗体TS2/18（ATCC HB195）または抗CD2抗体35.1（ATCC HB222）を各10

$\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で48穴プレート(コースター(Costar)社製)に各 $100\mu\text{l}$ ずつ固定化(1晩 4°C で放置)したものをPBSで洗浄した後に、実施例1でPPD処理した細胞懸濁液を各 $300\mu\text{l}$ 添加し、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター中、 37°C で7日間培養した。このとき比較コントロールとして、なにも固定化していないウェル(PPD処理のみ)およびIL-2(ベクトン・ディッキンソン社製)を $200\text{U}/\text{ml}$ 添加したものを用いた。7日間の培養後の細胞数は抗CD3抗体OKT3と抗CD2抗体TS2/18、抗CD3抗体OKT3と抗CD2抗体35.1、IL-2、なにも固定化していないウェルで各々、 $1.4\times 10^6/\text{ml}$ 、 $1.0\times 10^6/\text{ml}$ 、 $2.1\times 10^6/\text{ml}$ 、 $0.4\times 10^6/\text{ml}$ で抗体処理あるいはIL-2処理により顕著な増殖がみられた(図3)。培養後、各穴の細胞を回収し、3回PBSで洗浄した後に該細胞を10%のオートローガス血清を含むRPMI-1640培地 $100\mu\text{l}$ になるように懸濁し、細胞懸濁液を得た。

実施例3 免疫抑制能の評価

正常なヒトから採取した末梢血から、10%オートローガス血清を含むRPMI-1640培地を用いて $1\times 10^6/\text{ml}$ の正常ヒト末梢血細胞懸濁液を調製し、96穴底板プレート(コニング社製)に $100\mu\text{l}$ ずつ分注した。各ウェルにPPDを終濃度 $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは破傷風菌抗原TTを加え、同時に実施例1、2で得られた細胞をウェルあたり 1×10^6 個添加し、 $5\%\text{CO}_2$ インキュベーター中、 37°C で5日間培養した。その後、 $1\mu\text{Ci}$ の $[\text{^3H}]$ チミジンを各ウェルに添加し、15時間培養した後に細胞をセルハーベスター(ラボマッシュ(LABOMASH)、ラボサイエンス(LABOSCIENCE)社製)を用いて集め、その細胞中に取り込まれた $[\text{^3H}]$ の放射活性をシンチレーションカウンタ(LSC-700(アロカ(Aloka)社製))を用いて測定した。ポジティブコントロールとして、実施例1の細胞を加えるかわりに、 $30\mu\text{l}$ の10%のオートローガス血清を含むRPMI-1640培地を加えたウェルを測定対象とした。

【0025】その結果、図4及び図5に示すように、PPD-T細胞活性化の系に供せられたヒト細胞に対して、等量の実施例1で処理した細胞を加えることにより、約40%の抑制を示した(図4)。それに対して、TT-T細胞活性化の系では等量の細胞数を加えてもまったく抑制が観察されず、逆に $[\text{^3H}]$ の取り込み増が観察された(図5)。すなわち抗原、この場合はPPDに対して特異的な抑制性細胞が誘導されたことを示している。つぎに図6に示すように、実施例2で抗体処理した細胞を等量($30\mu\text{l}$ /ウェル)添加したもの(抗CD3抗体OKT3と抗CD2抗体TS2/18、抗CD3抗体OKT3と抗CD2抗体35.1)でPPD-T細胞活性化の系への影響を調べたところ共に95%以上の

抑制を示した。それに対してIL-2処理では約90%、PPD処理のみでは約35%の抑制を示しただけであった。抗体等による増殖により抑制能の低下があるかどうかを検討するために、単位細胞あたりの抑制能を算出した。なお陽性対照としては、処理した細胞を加えずPPDのみを加えた場合のT細胞の $[\text{^3H}]$ の取り込み量を用いた。

【0026】その結果、図7に示すように、抗体処理、特に抗CD3抗体OKT3と抗CD2抗体35.1の組み合わせによる増殖後では単位細胞あたりの抑制能はコントロールの無処理と比べ、まったく低下していなかった。抗CD3抗体OKT3と抗CD2抗体TS2/18との組み合わせでは25%の低下、IL-2処理では約半分に低下していることが観察された。これらから抗CD3抗体OKT3と抗CD2抗体35.1の組み合わせが抗原特異的抑制能を保ったまま細胞を増殖させるために最も適したものであることがわかった。

【0027】以上の結果は、抗原で処理することで誘導した抗原特異的抑制性細胞を固定化した抗体で処理することにより、その抑制能を失うことなく、増殖させることを可能にすることを示す例であり、実施例に含まれない抗CD3抗体OKT3単独の系、異なるエпитープを認識する2種類の抗CD2抗体の組み合わせでT細胞を増殖させる系でも同様の効果が期待できる。

【0028】

【発明の効果】本発明により、抗原存在下での培養で誘導された抗原特異的免疫抑制性細胞を、抗体あるいはサイトカインを固定化した培養器具で効率的に増殖させることで、免疫系の異常亢進を伴う疾患の効率的で副作用の少ない治療システムを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の培養器具の一実施例の説明図であって、(a)はヒト細胞添加時の断面説明図、(b)は培養時(a)を 90° 回転させた断面説明図、および(c)は(b)の上面説明図である。

【図2】本発明の培養器具の他の実施例の断面説明図である。

【図3】本発明の実施例1により得られた抗原特異的免疫抑制性細胞を実施例2で示すところの抗体あるいはIL-2固定化培養器具で処理した後の細胞数を表す。

【図4】実施例1で得られた細胞のPPD抗原特異的活性化反応に対する抑制能力を示す図である。

【図5】実施例2で得られた細胞のTT抗原特異的活性化反応に対する抑制能力を示す図である。

【図6】実施例2で得られた細胞を実施例3に記載した条件、抗体あるいはIL-2を固定化した培養器具で培養した後の培養液単位体積あたりに含まれる細胞によるPPD抗原特異的活性化反応の抑制能力を示す図である。

【図7】実施例2で得られた細胞を実施例3に記載した

11

12

条件、抗体あるいはIL-2を固定化した培養器具で培養した後の培養液の単位細胞あたりのPPD抗原特異的活性化反応の抑制能力（PPD処理のみを100とする）を示す図である。

【符号の説明】

1 ヒト細胞

2、22 細胞懸濁液

3、23 通気性フィルター

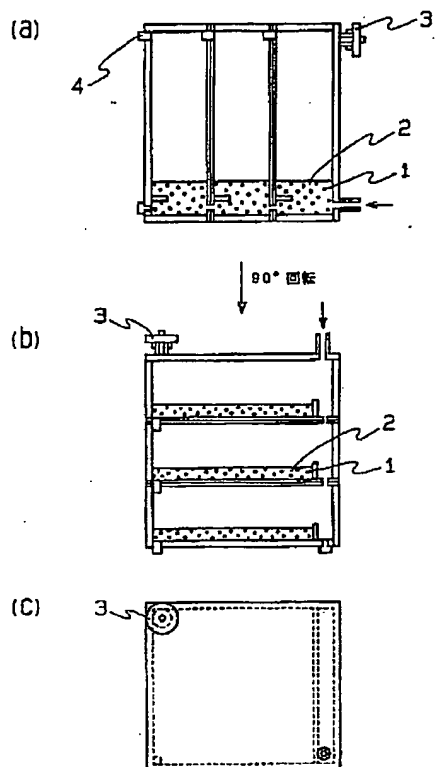
4 細胞回収口

25 球形微粒子

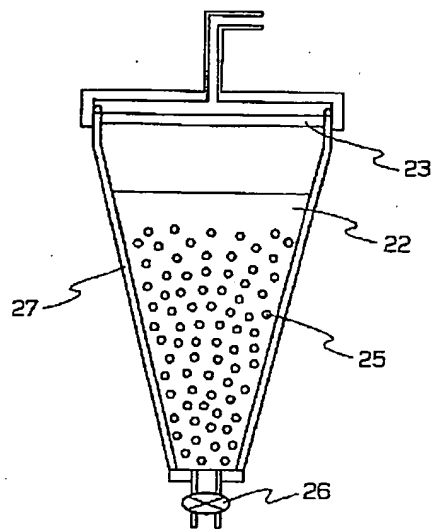
26 コック

27 側壁

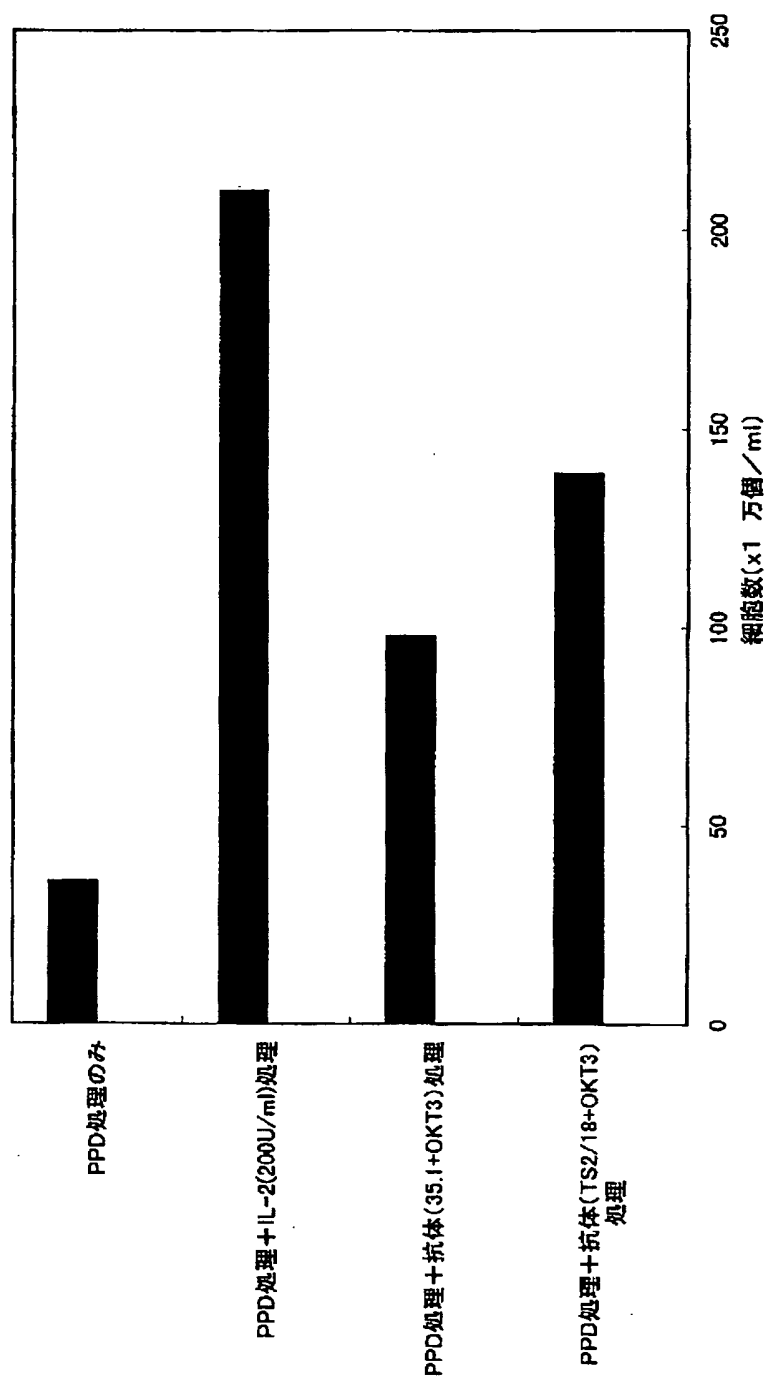
【図1】



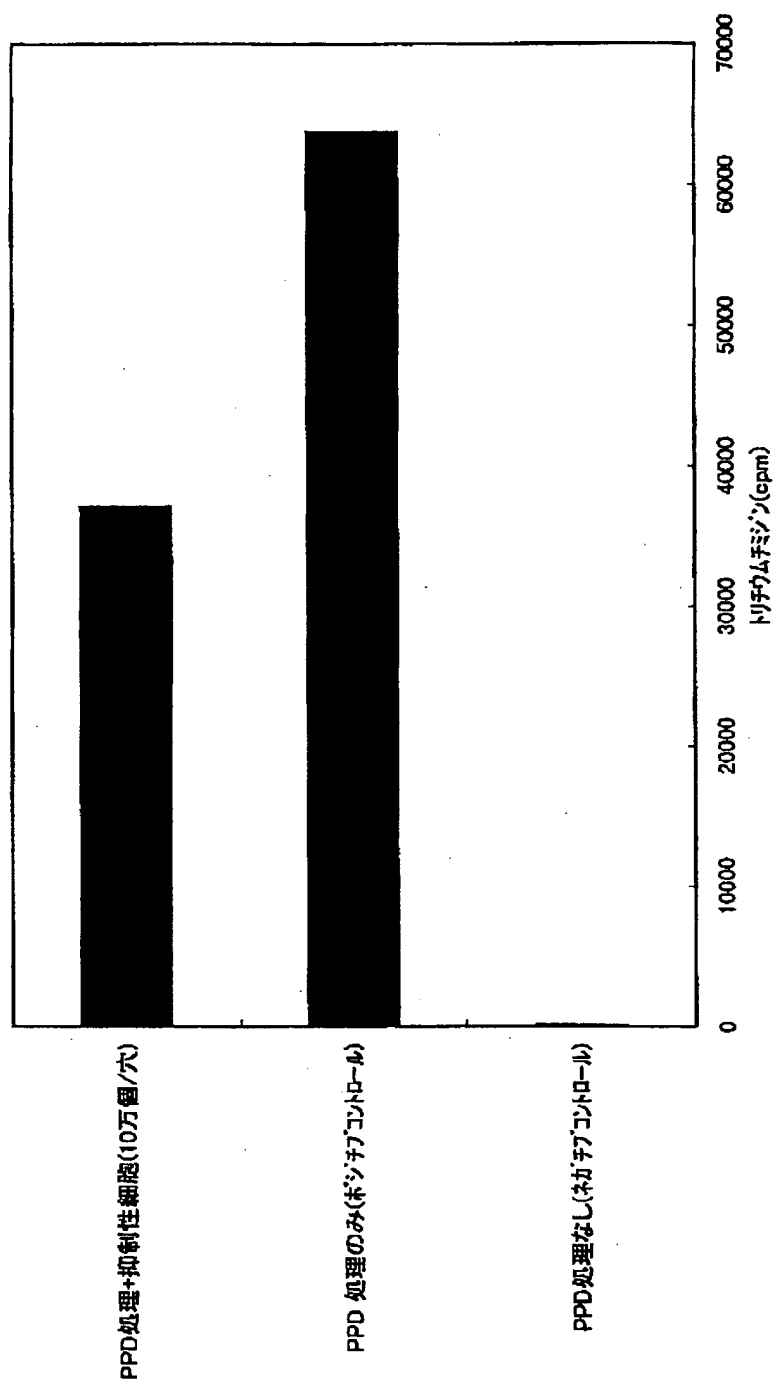
【図2】



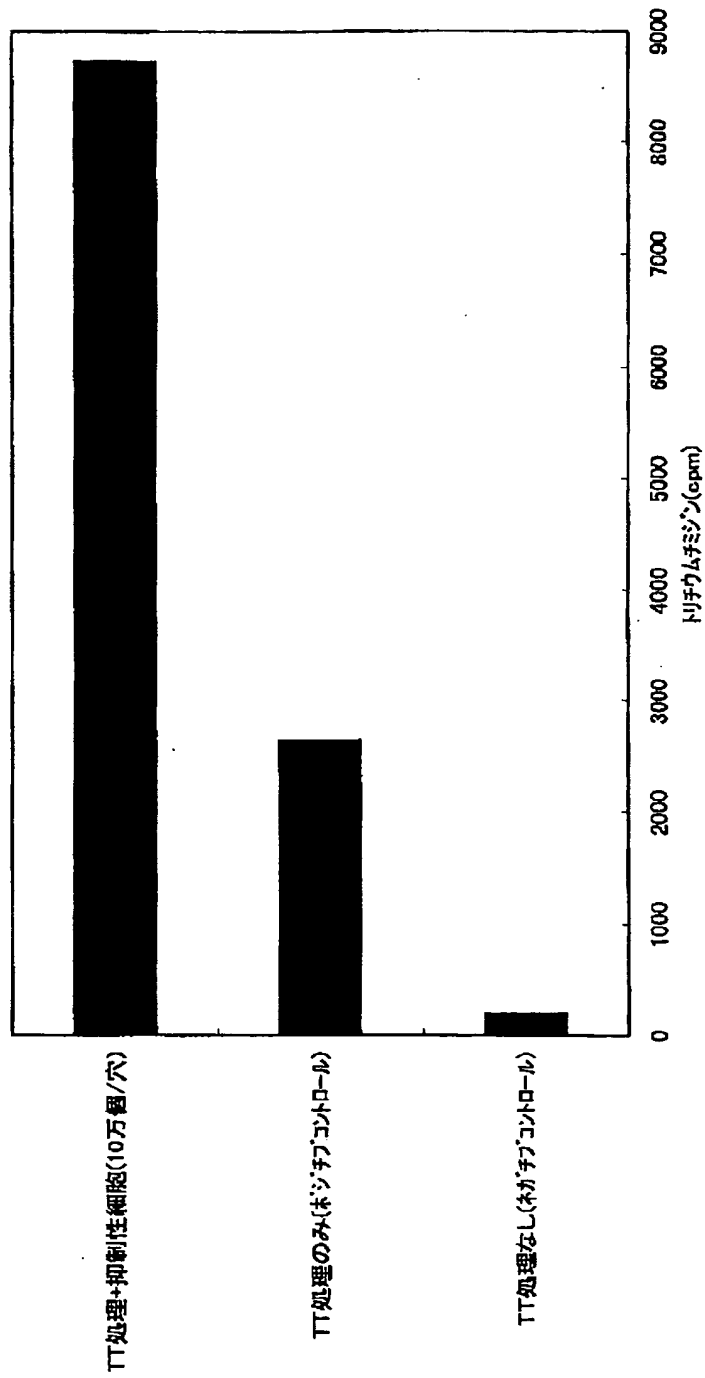
【図3】



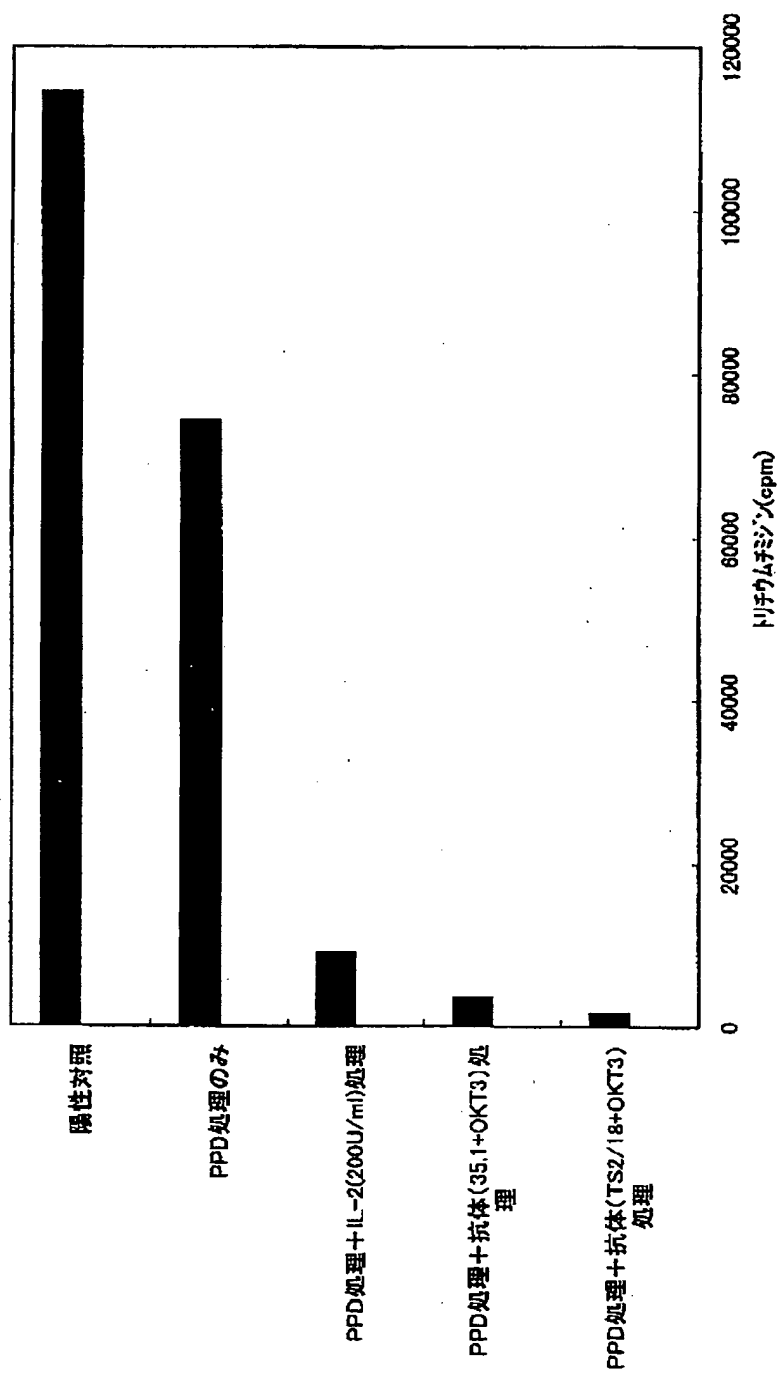
【図4】



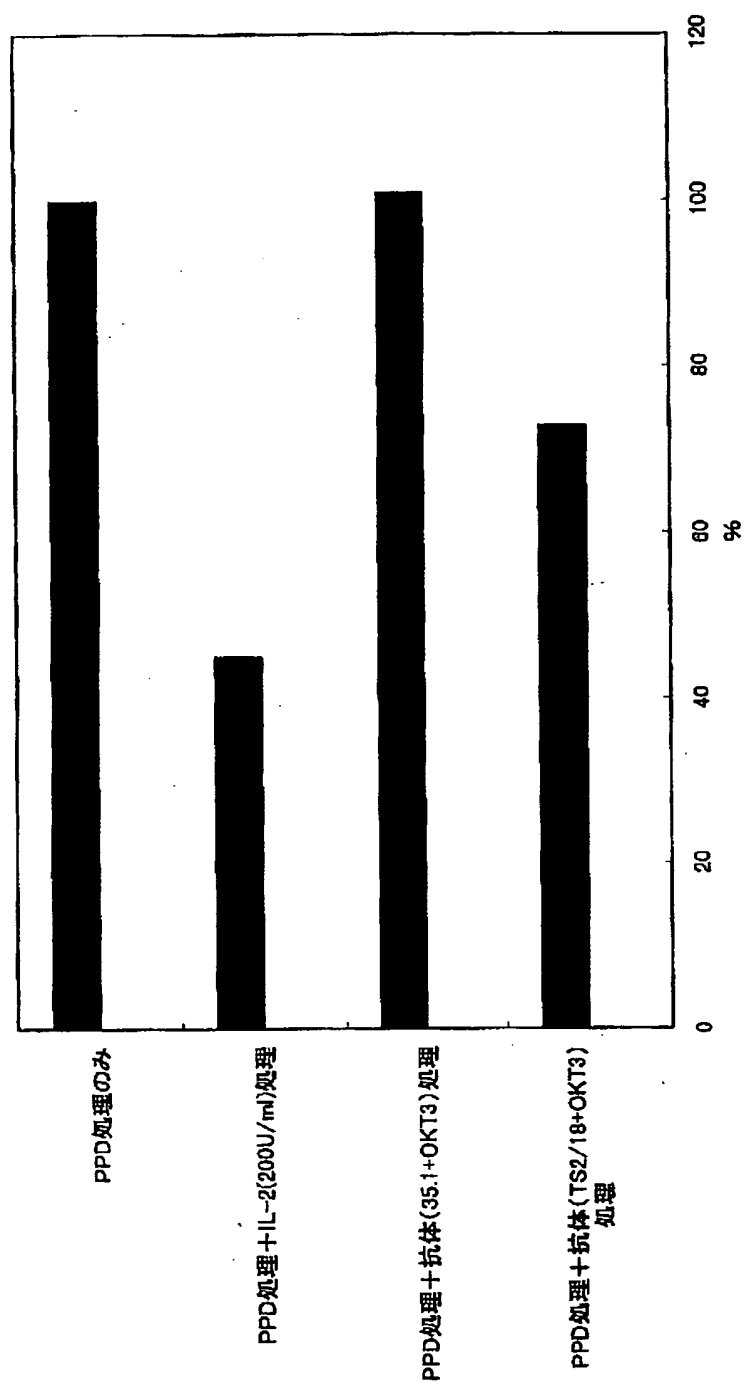
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

A 61 K 38/28
39/00

識別記号
ABG

FI

C 07 K 16/24
16/28

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)